

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局(43)国際公開日
2004年12月23日 (23.12.2004)

PCT

(10)国際公開番号
WO 2004/111250 A1(51)国際特許分類⁷: C12N 15/86, A61K 48/00, 38/17, A61P 25/28

(21)国際出願番号: PCT/JP2004/008224

(22)国際出願日: 2004年6月11日 (11.06.2004)

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:
特願2003-169714 2003年6月13日 (13.06.2003) JP
特願2003-371103 2003年10月30日 (30.10.2003) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立長寿医療センター総長が代表する日本国 (JAPAN AS REPRESENTED BY PRESIDENT OF NATIONAL CENTER FOR GERIATRICS AND GERONTOLOGY) [JP/JP]; 〒4748511 愛知県大府市森岡町源吾

36の3 Aichi (JP). 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 (PHARMACEUTICALS AND MEDICAL DEVICE AGENCY) [JP/JP]; 〒1000013 東京都千代田区霞が関三丁目3番2号 新霞が関ビル Tokyo (JP).

(72)発明者; および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 田平武 (TABIRA, Takeshi) [JP/JP]; 〒4748511 愛知県大府市森岡町源吾 36の3 国立長寿医療センター内 Aichi (JP). 原英夫 (HARA, Hideo) [JP/JP]; 〒4748511 愛知県大府市森岡町源吾 36の3 国立長寿医療センター内 Aichi (JP).

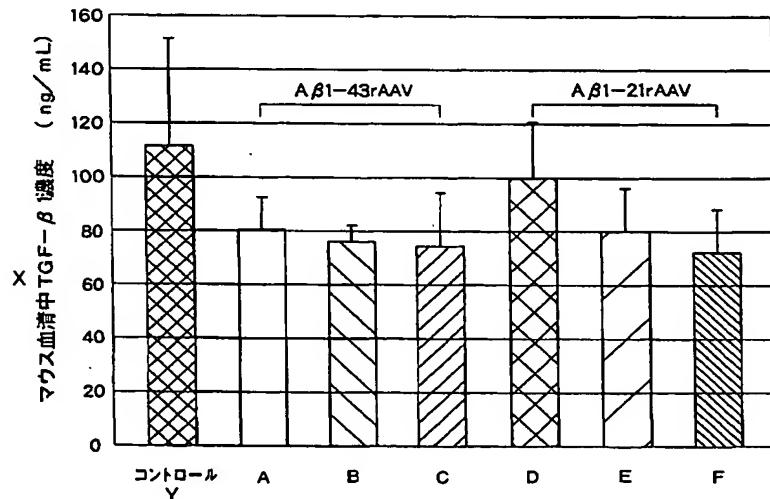
(74)代理人: 吉武賢次, 外 (YOSHITAKE, Kenji et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内三丁目2番3号 富士ビル323号 協和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81)指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,

[競業有]

(54)Title: RECOMBINANT ADENO-ASSOCIATED VIRUS VECTOR FOR TREATMENT OF ALZHEIMER DISEASE

(54)発明の名称: アルツハイマー病の治療のための組換えアデノ随伴ウィルスベクター

X...TGF- β 1 CONCN. IN MOUSE SERUM (ng/mL)
Y...CONTROL(57)Abstract: An adeno-associated virus vector capable of expressing a peptide fragment containing a liquid immunity induction region of β -amyloid peptide, which comprises a DNA coding for the peptide fragment in functioning form.(57)要約: 本発明は、 β アミロイドペプチドの液性免疫惹起部位を含むペプチド断片を発現しうるアデノ随伴ウィルスベクターであって、このペプチド断片をコードするDNAを機能しうる形で含んでなる、アデノ随伴ウィルスベクターを開示している。

WO 2004/111250 A1



ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,

BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

明細書

アルツハイマー病の治療のための組換えアデノ随伴ウィルスベクター 発明の背景

[0001] 技術分野

本発明は、アルツハイマー病に対して用いることが可能なA_βペプチドを発現するアデノ随伴ウィルスベクターおよびその医薬品としての使用に関する。

[0002] 背景技術

アルツハイマー病は、脳における老人斑、神経原纖維変化、ならびに神経細胞の変化および脱落により特徴づけられる。特に老人斑に沈着するβアミロイドは、アルツハイマー病の病態形成の中心的役割を果たしていると考えられている。このβアミロイド体の主成分であるβアミロイドペプチド(A_β)は、神経細胞内のβ-アミロイド前駆体タンパク質(βAPP)がβ,γ-分泌酵素によって部分的に分解されることにより生成される。

[0003] 近年、家族型アルツハイマー病変異を有するヒトアミロイド前駆体タンパク質を強発現するトランスジェニックマウスに対し、アジュバントと共にA_βペプチドを免疫投与することによって、老人斑の形成が抑制され、既に形成されている老人斑も減少することが報告されている(非特許文献1:Schenk D, Barbour R, Dunn W et al.:Nature 400:173-177, 1999)。

[0004] 上記作用の機序としては、現在3つの説がある。第一の説は、A_βペプチドを投与しA_βに対する抗体を体内で産生させ、老人斑の中の凝集したA_βに抗体が結合し、それをミクログリアが貪食することにより、老人斑が除去され、分泌されたA_βにも抗体が結合してミクログリアが貪食し、A_βの神経細胞への毒性を抑え、痴呆の改善などの治療に結びつくという説である。第二の説は、A_βペプチドを投与することによってA_βに対して産生された抗体は、A_βのN末端のアミノ酸を認識して結合し、凝集・不溶化したA_βを可溶化し、さらに分泌されたA_βの凝集・沈着を抑制することにより、アミロイド沈着を減少させるという説である。第三の説は、A_βに対する抗体は、血液脳関門を越えず、末梢血・末梢組織においてA_βを減少させることにより、中枢神経系からA_βを末梢に引き出すというsink説である。

[0005] 上記の仮説に基づき、ウィルスベクターを用いたアルツハイマー病の予防法および治療法の開発も試みられている。例えば、アデノウィルスベクターにA β cDNAを組み込み、C57BL/6マウスに経口投与することによって、マウス上部消化管組織にA β を発現させることができ、さらに、このマウスの血清中の抗A β 抗体は、in vitroにおいてA β ペプチドの凝集を阻害することが報告されている(非特許文献2:田平 武、原 英夫著、平成13年度 厚生化学研究「21世紀型医療開拓推進研究(痴呆分野)研究成果発表報告書」、財団法人 長寿科学振興財団出版、平成14年3月、p. 49-54)。しかし、この報告では、in vivo実験は行われておらず、動物における治療効果は確認されていない。

[0006] また、サイトカインであるTGF- β 1 (Transforming growth factor β 1)は、血管内皮細胞での炎症性サイトカイン(IL-1 β (Interleukin-1 β)、TNF- α (Tumor necrosis factor- α)など)の産生を促進することが知られている。そして、近年、TGF- β 1は、脳血管へのアミロイド沈着や、極小血管の変性など、アルツハイマー病と関連する病理変化を促進することが報告されている(非特許文献3; Wyss-Coray, T. et al.: Amyloidogenic role of cytokine TGF- β 1 in transgenic mice and Alzheimer's disease: Nature 389: 603-606, 1997、および非特許文献4; Wyss-Coray, T. et al.: Chronic overproduction of transforming growth factor- β 1 by astrocytes promotes Alzheimer's disease-like microvascular degeneration in transgenic mice: Am. J. Pathol. 156: 139-150, 2000)。

[0007] アルツハイマー病の治療剤には、中枢神経系での老人斑の形成およびアミロイドの沈着を抑制することが必要とされ、同時に、多臓器への拡散がないこと、脳炎などの副作用を起こさないことなど、安全性も求められる。しかし、これらの条件を満たす、A β 抗原を利用した治療剤は、これまで報告されていない。

発明の概要

[0008] 本発明者らは、今般、組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)を用いて、液性免疫を惹起させるA β 抗原を腸管細胞に発現させ、このA β 抗原に対する抗体産生を誘導することにより、脳においてアミロイド沈着および老人斑形成が減少することを見出した。さらに、本発明者らは、この組換えアデノ随伴ウイルスを用いると、脳および腎臓な

どの他臓器に炎症所見が認められないことを見出した。本発明はこれらの知見に基づくものである。

- [0009] 従って、本発明は、アルツハイマー病の治療に用いることのできる、 $A\beta$ 抗原を発現するアデノ随伴ウイルスベクターおよびこれを含む医薬組成物の提供を目的とする。
- [0010] そして、本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターは、 β アミロイドペプチドの液性免疫惹起部位を含むペプチド断片を発現しうるアデノ随伴ウイルスベクターであって、このペプチド断片をコードするDNAを機能しうる形で含んでなる、ものである。
- [0011] さらに、本発明による医薬組成物は、本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターを含んでなる、アルツハイマー病を治療するための医薬組成物である。
- [0012] 本発明によれば、組換えアデノ随伴ウイルスベクターを利用して、細胞性免疫を惹起せずに抗体産生を誘導することができ、中枢神経系での老人斑の形成およびアミロイドの沈着を抑制できる。さらに、この組換えアデノ随伴ウイルスを用いると、血中のTGF- β 1濃度を減少させ、脳血管へのアミロイド沈着および脳の極小血管の変性的進行を抑制できる。さらに、本発明による組換えアデノ随伴ウイルスベクターによれば、脳炎、肝障害等の副作用を起こさない安全性の高いアルツハイマー病の治療が可能となる。

図面の簡単な説明

- [0013] [図1]は、 $A\beta$ 1-43を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを経口投与したマウスからの血清中の抗 $A\beta$ 抗体産生量を示す。
- [図2]は、マウス血清中の抗 $A\beta$ 抗体によるin vitroでの $A\beta$ 凝集抑制効果を示す。
- [図3]は、治療したマウスの脾細胞の $A\beta$ 42ペプチドに対する細胞増殖反応性を示す。
- [図4]は、 $A\beta$ 1-43を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを経口投与したマウスにおける、前頭葉皮質・頭頂葉・海馬の領域の平均 $A\beta$ 蕪積面積率を示す。
- [図5]は、 $A\beta$ 1-21を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを経口投与したマウスにおける、前頭葉皮質・頭頂葉・海馬の領域の平均 $A\beta$ 蕴積面積率を示す。
- [図6]は、 $A\beta$ 1-43、または $A\beta$ 1-21を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを経口

投与したマウスからの血清中のTGF- β 1濃度を示す。

発明の具体的説明

- [0014] 本発明によるアデノ随伴ウィルスベクターは、 β アミロイドペプチド($A\beta$ ペプチド)の液性免疫惹起部位を含むペプチド断片をコードするDNAを、機能しうる形で含んでなり、これにより該ペプチド断片を発現することができる。ここで「機能しうる形で含んでなる」とは、適切な調節エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー、転写ターミネーターなど)の制御下に、導入遺伝子(DNA)の発現を可能にする様式で、そのベクター中に該導入遺伝子が挿入されていることを意味する。
- [0015] $A\beta$ ペプチドの液性免疫惹起部位は、当業者であれば容易に特定することができる。例えば、前記液性免疫惹起部位は $A\beta$ ペプチドの第4ー10アミノ酸($A\beta$ 4ー10)の領域中に存在する。よって、本発明によるアデノ随伴ウィルスベクターによって発現される前記抗原ペプチド断片は、 $A\beta$ 4ー10を含んでなることが好ましい。
- [0016] また、 $A\beta$ 4ー10のアミノ酸配列としては、配列番号2で表されるアミノ酸配列中の第4ー10アミノ酸が挙げられる。従って、前記抗原ペプチド断片は、配列番号2で表されるアミノ酸配列中の第4ー10アミノ酸を含んでなることが好ましい。このアミノ酸配列をコードするDNAのヌクレオチド配列は特に制限されるものではないが、例えば、配列番号1で表されるヌクレオチド配列中の第10ー30ヌクレオチドが挙げられる。従って、前記抗原ペプチド断片をコードするDNAは、配列番号1で表されるヌクレオチド配列中の第10ー30ヌクレオチドを含んでなることが好ましい。
- [0017] 本発明の好ましい実施態様によれば、前記抗原ペプチド断片は、 $A\beta$ ペプチドの第1ー43アミノ酸($A\beta$ 1ー43)を含んでなるものとされる。 $A\beta$ 1ー43のアミノ酸配列としては、配列番号2で表されるアミノ酸配列が挙げられ、従って、前記抗原ペプチド断片は、配列番号2で表されるアミノ酸配列を含んでなることが好ましい。このアミノ酸配列をコードするDNAのヌクレオチド配列は特に制限されるものではないが、例えば、配列番号1で表されるヌクレオチド配列が挙げられ、従って、前記抗原ペプチド断片をコードするDNAは、配列番号1で表されるヌクレオチド配列を含んでなることが好ましい。
- [0018] 本発明の他の好ましい実施態様によれば、前記抗原ペプチド断片は、 $A\beta$ ペプチ

ドの第1ー21アミノ酸($\text{A}\beta 1\text{-}21$)を含んでなるものとされる。 $\text{A}\beta 1\text{-}21$ のアミノ酸配列としては、配列番号4で表されるアミノ酸配列が挙げられ、従って、前記抗原ペプチド断片は、配列番号4で表されるアミノ酸配列を含んでなることが好ましい。このアミノ酸配列をコードするDNAのヌクレオチド配列は特に制限されるものではないが、例えば、配列番号3で表されるヌクレオチド配列が挙げられ、従って、前記抗原ペプチド断片をコードするDNAは、配列番号3で表されるヌクレオチド配列を含んでなることが好ましい。

- [0019] 前記 $\text{A}\beta 1\text{-}43$ および $\text{A}\beta 1\text{-}21$ のアミノ酸配列には、液性免疫惹起部位のみならず、T細胞受容体認識配列も含まれるが、本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターによって腸管粘膜免疫系にこれら抗原ペプチド断片を発現させた場合、主に抗体産生を誘導し、細胞性免疫はほとんど惹起しない。
- [0020] 本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターによって発現された前記抗原ペプチド断片を抗原として効率よく提示するためには、感染細胞内での発現の後に、該抗原ペプチド断片が細胞外に分泌されることが好ましい。従って、本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターは、好ましくは、発現された前記抗原ペプチド断片を細胞外に分泌させができるシグナルペプチドをコードするDNAを、機能しうる形で含んでなるものとされる。ここで「機能しうる形で含んでなる」とは、前記シグナルペプチドが前記抗原ペプチド断片とともに発現され、かつ、発現された前記抗原ペプチド断片が前記シグナルペプチドによって細胞外に分泌されることを意味する。前記シグナルペプチドをコードするDNAを機能しうる形で本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターに組み込む方法としては、当業者に公知のものを用いることができるが、例えば、前記抗原ペプチド断片のN末端に結合した形で前記シグナルペプチドが発現するように、それぞれのDNAを融合させた融合遺伝子を用いることができる。
- [0021] 前記シグナルペプチドとしては、当業者に公知のものを用いることができるが、好ましくはアミロイド前駆体タンパク質(APP)のN末端に存在するシグナルペプチドが用いられる。APPシグナルペプチドのアミノ酸配列としては配列番号6で表されるアミノ酸配列が挙げられ、よって、本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターにより発現される前記シグナルペプチドは、配列番号6で表されるアミノ酸配列を含んでなるもので

あることが好ましい。このアミノ酸配列をコードするDNAのヌクレオチド配列は特に制限されるものではないが、例えば、配列番号5で表されるヌクレオチド配列が挙げられ、従って、前記シグナルペプチドをコードするDNAは、配列番号5で表されるヌクレオチド配列を含んでなることが好ましい。

- [0022] 本発明の好ましい実施態様によれば、本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターは、APPシグナルペプチドがA β 1-43のN末端に連結した融合タンパク質をコードするDNAを含んでなるものとされる。この融合タンパク質のアミノ酸配列としては、配列番号8で表されるアミノ酸配列が挙げられ、これをコードするDNAのヌクレオチド配列としては、配列番号7で表されるヌクレオチド配列中の第9ー191ヌクレオチドが挙げられる。
- [0023] 本発明の他の好ましい実施態様によれば、本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターは、APPシグナルペプチドがA β 1-21のN末端に連結した融合タンパク質をコードするDNAを含んでなるものとされる。この融合タンパク質のアミノ酸配列としては、配列番号10で表されるアミノ酸配列が挙げられ、これをコードするDNAのヌクレオチド配列としては、配列番号9で表されるヌクレオチド配列中の第17ー133ヌクレオチドが挙げられる。
- [0024] さらに、本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターは、目的のDNAを効率よく発現させるための調節エレメント、例えば、プロモーター、エンハンサー、転写ターミネーターなどを含んでいてもよく、必要に応じて、翻訳開始コドン、翻訳終止コドンなどを挿入してもよい。
- [0025] 本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターは、当技術分野で周知となっている標準的方法により調製することができる。例えば、米国特許第5, 858, 351号およびそこに引用される参考文献には、遺伝子治療における使用に適切な種々の組換えアデノ随伴ウイルス、ならびにそれらのベクターの作製方法および増殖方法が記載されている(例えば、Kotin(1994)Human Gene Therapy 5:793ー801、またはBerns「Parvoviridae and their Replication」Fundamental Virology、第2版、Fields & Knipe編など)。
- [0026] アデノ随伴ウイルスベクターを作製するための好ましい方法によれば、まず、野生型

アデノ随伴ウィルスの両端のITRを残し、その間に目的の遺伝子を挿入することによりプラスミドを作製する(AAVベクタープラスミド)。一方、Rep遺伝子(複製蛋白をコードする遺伝子)およびCap遺伝子(ウィルスの頭殻蛋白をコードする遺伝子)を発現するプラスミド、ならびにアデノウイルス遺伝子であるE2A、E4、およびVAの各遺伝子を発現するプラスミドを用意する。次いで、これら3種のプラスミドを、E1遺伝子を発現するパッケージング細胞、例えばHEK293細胞に同時トランسفエクションし、この細胞を培養する。これにより、哺乳動物細胞に対して高い感染能力を持つアデノ随伴ウイルスベクター粒子を產生することができる。このような方法は、AAV-Helper-Free System(Stratagene)などの市販のキットを用いて容易に行なうことができる。

- [0027] 本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターは、哺乳動物のアルツハイマー病の治療に用いることができる。従って、本発明によれば、治療上有効量の本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターを被験者に投与することを含んでなる、アルツハイマー病の治疗方法、ならびにアルツハイマー病の治療剤の製造における、本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターの使用が提供される。ここで、「治療」には、確立された病態を治療することだけでなく、将来確立される可能性のある病態を予防することも含む。前記被験者は哺乳動物、例えば、げつ歯類、イヌ、ネコ、ウシ、靈長類などとされ、好ましくはヒトとされる。
- [0028] 本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターの投与方法は、遺伝子治療の分野において使用可能な方法、例えば、腹腔内注入、気管内注入、気管支内注入および直接的な気管支内滴注、皮下注入、経皮輸送、動脈内注入、静脈内注入等(FlotteおよびCarter, Gene Therapy 2:357-362(1995)参照)とされる。さらに、アデノ随伴ウィルスは、胃液によって分解されにくいため、経口投与できるという利点を有する。また、経口投与は、被験者が自ら投与することができるという点で、特に好ましい。
- [0029] 投与されるアデノ随伴ウイルスベクターの量は治療上有効量であればよく、このような量は遺伝子治療分野の当業者であれば容易に決定することができる。また、投与量は、被験者の病態の重篤度、性別、年齢、体重、習慣等によって調整することが好ましいが、このような投与量の調整は、医師または獣医によって適宜行なわれる。例えば、経口投与されるアデノ随伴ウイルスベクターの量は、通常 0.5×10^{11} ～ $2.0 \times$

10^{12} viral genome／体重kgであり、好ましくは 1.0×10^{11} — 1.0×10^{12} viral genome／体重kg、より好ましくは 1.0×10^{11} — 5.0×10^{11} viral genome／体重kgとされる。本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターは上記の投与量の範囲内において、医薬上安全である。ここで、「viral genome」という単位は、アデノ随伴ウイルスのゲノムの分子数(ウイルス粒子数)を表すものであり、アデノ随伴ウイルスベクターの量を示すものとして当業者には周知である。その数値は、精製したアデノ随伴ウイルス溶液を希釈してドットプロットハイブリダイゼーションを行ない、そのシグナル強度を所定の分子数のプラスミドDNAと比較することにより決定することができる。

- [0030] 本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターは、一旦被験者に投与すると、比較的長期間にわたってアルツハイマー病の治療作用が持続する。特に、上記の量で経口投与した場合には、腸管上皮細胞において抗原が少なくとも6ヶ月以上提示され、これに対する抗体産生が誘導されることが確認されている。この点に鑑み、当業者であれば適切な投薬計画を作成することができる。
- [0031] 本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターは、これを含む医薬組成物として被験者に投与することができる。従って、本発明によれば、本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターを含んでなる、アルツハイマー病を治療するための医薬組成物が提供される。本発明の好ましい実施形態によれば、この医薬組成物は経口投与のためのものとされる。
- [0032] 本発明による医薬組成物は、その投与経路および剤型に応じて、当技術分野において公知の方法により調製することができる。例えば、経口投与のための医薬組成物としては、カプセル剤、溶液剤等の剤型が使用可能である。従って、本発明による医薬組成物は、それぞれの剤型に応じて、医薬上許容される担体、希釈剤、保存剤等を含むことができる。

実施例

- [0033] 以下、本発明を実施例によってより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。なお、以下の試験例で用いるマウスは、アルツハイマー病のモデルマウスのAPPトランスジェニックマウス(Tg2576, Taconic社、Mayo Clinic)である。

[0034] 実施例1APP シグナル配列 + A β 1-43 cDNAを発現するアデノ随伴ウィルスベクターの構築

アミロイド- β 1-43(A β 1-43) cDNAは、ヒトアミロイド前駆タンパク質(APP)遺伝子を鑄型として以下のプライマーを用いるPCRにて増幅した。PCR反応液の組成は、TAPS緩衝液(25mM, pH9.3)、KC1(50mM)、MgCl₂(2mM)、2-メルカプトエタノール(1mM)、dNTPs(100 μM)、鑄型DNA(50～100ng)、およびプライマー(各0.2 μM)とした。サイクル反応の温度条件は、94°Cで30秒間、68°Cで1分間、および72°Cで3分間を1サイクルとし、これを30サイクルとした。

[0035] プライマー

フォワード：5'-GATGCAGAATTCCGACATGACTCAGGA-3'(配列番号11)；および

リバース：5'-GTCTTAAGTCGCTATGACAACACCGCCC-3'(配列番号12:3'にAflII部位を有する)。

[0036] APPの分泌シグナルであるN末の最初のシグナル配列(配列番号10)のアダプターは、以下の2つのオリゴヌクレオチドを90°Cで3分間処理後、室温でアニーリングさせることにより作製した。

[0037] オリゴヌクレオチド

センス

:5'-GGTCTAGAATGCTGCCCGGTTGGCACTGCTCCTGCTGGCCGCCTGGA
CGGCTCGGGCGCTT-3'(配列番号13)；

アンチセンス

:5'-AGCGCCCCGAGCCGTCCAGGCCAGCAGGAGCAGTGCCAAACCGGGC
AGCATTCTAGACC-3'(配列番号14)。

[0038] APPの分泌シグナルアダプター(センス鎖の3'側に突出したT残基を持つ)とPCRで増幅したA β 1-43 cDNA(アンチセンス鎖の3'側に突出したA残基を持つ)を結合し、これを鑄型として以下のプライマーを用いてPCRを行い、APPシグナル配列をA β 1-43cDNAの5'側に結合させた融合遺伝子：APPシグナル配列+A β 1-4

3cDNA(配列番号7:この配列中の第3ー8ヌクレオチドはXbaI認識部位である)を作製した。PCR反応液の組成は、TAPS緩衝液(25mM, pH9.3)、KCl(50mM)、 $MgCl_2$ (2mM)、2-メルカプトエタノール(1mM)、dNTPs(100 μ M)、鑄型DNA(50ー100ng)、およびプライマー(各0.2 μ M)とした。サイクル反応の温度条件は、94°Cで30秒間、68°Cで1分間、および72°Cで3分間を1サイクルとし、これを30サイクルとした。

[0039] プライマー

フォワード :5'-GGTCTAGAATGCTGCCCGGTTGGCAC-3'(配列番号15:5'側にXbaI部位を有する);

リバース :5'-GTCTTAAGTCGCTATGACAACACCGCCC-3'(配列番号12:5'側にAflIII部位を有する)。

[0040] 効率よくアデノ随伴ウイルスのDNAパッケージングを得るには、適度な長さ(4ー4.5kb)のDNAが必要であるので、APPシグナル配列+A β 1ー43cDNA(XbaI-AflIII/blunt)に、非機能的な"stuffer" DNAとしてpBR322プラスミドDNAのPvuII-SalI断片を結合させ、標準的なアデノ随伴ウイルスベクター(pXXUF1)のXbaI-SalI部位に組み込んだ。

[0041] さらに、上記の組換えpXXUF1、ならびに標準的なRep/Capプラスミド、およびE2A/E4/VAプラスミドの3種類のベクターをHEK293細胞にリン酸カルシウム法にて遺伝子導入し、HEK293細胞を大量培養後、細胞溶解物からウイルス粒子をCsClの超遠心により精製して、APPシグナル配列+A β 1ー43cDNAを有するアデノ随伴ウイルスベクターを得た。

[0042] 実施例2

APPシグナル配列+A β 1ー21cDNAを発現するアデノ随伴ウイルスベクターの構築

APPシグナル配列+A β 1ー43cDNA(XbaI-AflIII/blunt)をpBluescriptプラスミド(XbaI-SmaI)に組み込んだ。これを鑄型として、以下のプライマーを用いてPCRを行った。

[0043] プライマー

フォワード:5'-TGGCGGCCGCTCTAGAATG-3' (配列番号16:5'側にNotI部位を有する);

リバース:5'-CACATCTTAAGCAAAGAACACC-3' (配列番号17)。

[0044] APPシグナル配列+A β 1-21cDNA(配列番号9:この配列中の第3ー10ヌクレオチドはNotI認識部位であり、第11ー16ヌクレオチドはXbaI認識部位である)のPCR産物を、NotI-AfIII/blunt処理し、上記の"stuffer" pBR322 PvuII-SalII断片とともにpXXUF1(NotI-SalII)に組み込んだ。

[0045] さらに、実施例1と同様にして、APPシグナル配列+A β 1-21cDNAを有するアデノ随伴ウイルスベクターを得た。

[0046] 比較例1

コントロールとして、GFP グリーン蛍光タンパク質)を発現するアデノ随伴ウイルス(GFPrAAV)を作製した。

[0047] 試験例1

ウェスタンプロット解析

APPシグナル配列+A β 1-43cDNAを発現ベクターpXXUF1に組み込み、lipofectamine 2000(In vitrogen)を用いてHEK293細胞へ導入した48時間後に培養上清と細胞溶解物を抽出し、それぞれ抗A β 抗体(4G8)で免疫沈降後、SDS-PAGEゲルに電気泳動した。そして、ニトロセルロース膜に蛋白を転写した後、抗A β 抗体によってA β 蛋白の検出を試みた。その結果、A β はオリゴマーを形成しながら細胞外に分泌されること、および細胞内では多量の4kDaのA β ペプチドモノマー蛋白が生成していることが確認された。

[0048] 試験例2

マウス血清の採取

15週齢のマウスに、実施例1のアデノ随伴ウイルスベクター 5×10^{11} viral genomeを1回のみ経口投与した。このマウスの血清を1ヶ月後、4ヶ月後、および6ヶ月後にそれぞれ採取した。

[0049] マウス血清中の抗A β 抗体の検出

A β 1-42ペプチド(5mg/mL)を96ウェルプレート(Nunc, MaxiSorp製)の各ウェ

ルに付着させ、5% non-fat milk/TBS-T bufferでブロックした後、上記の採取したマウス血清を加え(500倍希釀)、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体で検出した。抗体価の評価は、ELISAリーダーでの吸光度測定により行った。その結果を図1に示す。

[0050] 血清中の抗体価は、主として経口投与後1ヶ月でピークを示し、6ヶ月後まで抗体の持続的産生を認めた。

[0051] 試験例3

マウス血清によるA_β凝集反応の阻害試験

A_β 1–40ペプチドを120mMの濃度に調整し、37°Cでインキュベーションした。24時間後にA_βの凝集が開始するのが見られた。このA_βの凝集物にマウスの血清を1:10および1:20(vol: vol)の濃度で加え、37°Cで1週間インキュベーションした。A_β 1–40の結合・凝集をマウスの血清が阻害するかどうか、2mMチオフラビン-Tを加え、分光蛍光計(445nmでの励起; 490nmでの発光)を用いて測定した。その結果を図2に示す。

[0052] 試験例1で示したアデノ随伴ウイルスベクター投与後6ヶ月のマウス血清は、コントロールのマウス血清と比べ、有意にin vitroでA_β 1–40の凝集・結合を阻害した。

[0053] 試験例4

組織からのDNA抽出及びPCR

実施例1のアデノ随伴ウイルスを経口投与した後、28週間のマウスより、心、肺、脾臓、肝臓、上部消化管および腎臓を摘出し、Tris溶液中で組織をホモジネートした後、プロテイナーゼKで蛋白を分解し、フェノール／クロロホルム処理し、DNAを精製した。次に、アデノ随伴ウイルスベクター(pXXUF1)のプロモーター領域の5'側塩基配列とベクターの3'側塩基配列から以下のプライマーを作製し、PCRを行った。PCR反応液の組成は、TAPS緩衝液(25mM、pH9.3)、KCl(50mM)、MgCl₂(2mM)、2-メルカプトエタノール(1mM)、dNTPs(100 μM)、鑄型DNA(50–100ng)、およびプライマー(各0.2 μ M)とした。サイクル反応の温度条件は、94°Cで1分間、68°Cで20秒間、および72°Cで1分間を1サイクルとし、これを30サイクルとした。PCR産物を2%アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムプロミドで染色した。

[0054] プライマー

フォワード:5'-AGTGAACCGTCAGATCGC-3' (配列番号18) ;
リバース:5'-CGGTATCAGCTCACTCAA-3' (配列番号19)。

[0055] 目的とするPCR産物を示す500bpのバンドは、上部消化管組織のみに認められた。
。

[0056] 試験例5マウス脾細胞のA_β 1-42ペプチドに対する細胞増殖反応

実施例1のアデノ随伴ウイルスを経口投与した後28週間のマウスより脾細胞を分離し、96ウェルプレートの1ウェルあたり5×10⁴細胞を加え、A_β 1-42ペプチドを各濃度で加えた培養液中で48時間培養した。細胞培養終了後、テトラゾリウム塩(WST-1)を加えた。テトラゾリウム塩は、生細胞にのみ活性のあるミトコンドリアのコハク酸テトラゾリウム還元酵素によりホルマザン色素に変換されるので、ELISAリーダーで色素溶液の吸光度を測定することにより、細胞増殖能反応を判定した。その結果を図3に示す。

[0057] 実施例1のアデノ随伴ウイルスを経口投与したマウスの脾細胞は、A_β 1-42ペプチドの濃度に関係なく、細胞増殖反応は低応答であった。

[0058] 試験例6組織染色試験1

実施例1のアデノ随伴ウイルスを経口投与したマウス(以下「治療群」という)、または未処置の同齢マウス(以下「コントロール群」という)から、投与後6ヶ月(10ヶ月齢)経過時に組織を得て、その組織の凍結切片を用いて以下の実験を行った。組織中のA_β蛋白や老人斑を検出するために、70%ギ酸で処理し、5% H₂O₂で内因性のペルオキシダーゼ活性を失活させた。抗A_β抗体(4G8:1000倍希釈)またはラビット抗A_β 40抗体(1000倍希釈)と反応させた後、ペルオキシダーゼ標識2次抗体を加え、DAB染色を行った。

[0059] コントロール群では、加齢と共にアミロイド沈着が進み、6ヶ月齢では脳に軽度の沈着を認められ、10ヶ月齢になるとアミロイド沈着は著明になり、老人斑の形成も認められ、神経細胞内のアミロイド沈着も散見された。

[0060] 一方、治療群では、投与後6ヶ月(10ヶ月齢)に解剖したところ、上部消化管上皮細胞にA β 蛋白の発現が認められた。また、投与後6ヶ月の脳を解析すると、コントロール群に比べ明らかにアミロイド沈着が減少し、老人斑も激減していた。投与後6ヶ月の脳の矢状断面におけるアミロイド斑の数を計測した結果を表1に示す。

[0061] [表1]

表1：マウスのコントロール群と治療群の脳のアミロイド沈着の比較

群	細胞外 アミロイド斑	細胞内 アミロイド斑
コントロール群	76	++
治療群	8	±

マウス：10ヶ月齢

[0062] コントロール群では、アミロイド斑数は平均76個であるのに対し、投与群では8個と約90%減少していた。コントロール群に散見された神経細胞内のアミロイド沈着は、治療群では殆ど認められなかった。

[0063] 試験例7

組織染色試験2

試験例6と同様に、治療群およびコントロール群から、投与後6ヶ月(10ヶ月齢)経過時に組織を得て、その組織の凍結切片を用いて以下の実験を行った。抗CD4抗体、抗CD86抗体、抗CD11b抗体、抗GFAP抗体(アストロサイト)、抗Iba-1抗体(ミクログリア)などの抗体を用いて凍結切片をABC法にて染色して、中枢神経系におけるリンパ球の浸潤の有無を確認した。その結果を表2に示す。

[0064] [表2]

表2：免疫組織染色

	コントロール群	治療群
CD 4	(-)	(-)
CD 8 6	(-)	(-)
CD 1 1 b	(-)	(-)
G F A P	(+++)	(+)
I b a - 1 (ミクログリア)	(+)	(++~+++)

[0065] 脳組織をT細胞マーカーであるCD4およびT細胞活性化分子であるCD86でそれぞれ染色したところ、コントロール群および治療群とも陰性であった。末梢のマクロファージマーカーであるCD11bについても陰性であった。アストロサイトマーカーであるGFAPについては、両群で差が認められた。治療群の前頭葉および側頭葉において、活性化したミクログリア(Iba-1陽性)の増加が認められた。

[0066] 試験例8

組織染色試験3

実施例2のアデノ随伴ウイルスを経口投与したマウス(以下「治療群2」という)またはコントロール群から、投与後6ヶ月(10ヶ月齢)経過時に組織を得て、その組織の凍結切片を用いて試験例6と同様にDAB染色を行った。

[0067] 治療群2において、投与後6ヶ月(10ヶ月齢)の脳を解析すると、コントロール群に比べ明らかにアミロイド沈着が減少し、老人斑も激減していた。

[0068] 試験例9

A_β蓄積面積率の比較1

4匹のマウスからなる3群を用意し、それぞれ、15週齢時(以下「A群」という)、30週齢時(以下「B群」という)、または45週齢時(以下「C群」という)に実施例1のアデノ随伴ウイルス(5.0×10^{11} viral genome/匹)を1回経口投与した。また、6匹のマウスからなるコントロール群を用意し、15週齢時にPBS(0.1mL/匹)を経口投与した。その後、12~13ヶ月齢(52~56週齢)の時点で各群を解剖し、前頭葉皮質・頭頂葉・海馬の領域において、それぞれ脳組織切片を得た。そして、これらの組織切片を試

験例6と同様に染色し、顕微鏡に連結させた3CCDカメラ用いて観測し、各領域におけるA_β蓄積部分の面積を測定した。そして、各測定部位に占めるA_β蓄積部分の面積率を計算した。その結果を図4に示す。

[0069] コントロール群では、上記A_β蓄積部分の3つの脳測定領域における平均面積率は2.64±1.46%であった。一方、15週齢時投与のA群では0.55±0.50%であり、30週齢時投与のB群では0.48±0.35%であり、45週齢時投与のC群では0.46±0.27%であり、いずれもコントロール群と比較して、有意に低い値を示した(一元配置分散分析法(one-way variance analysis, ANOVA)およびスチューデントt検定, p<0.001)。

[0070] 試験例10

A_β蓄積面積率の比較2

4匹のマウスからなる3群を用意し、それぞれ、15週齢時(以下「D群」という)、30週齢時(以下「E群」という)、または45週齢時(以下「F群」という)に実施例2のアデノ随伴ウイルス(5.0×10¹¹viral genome/匹)を1回経口投与した。その後、各群を試験例9と同様に処理し、各測定部位に占めるA_β蓄積部分の面積率を計算した。その結果を図5に示す。

[0071] 上記A_β蓄積部分の面積率は、15週齢時投与のD群では0.39±0.27%であり、30週齢時投与のE群では0.45±0.30%であり、45週齢時投与のF群では0.37±0.20%であり、いずれも試験例9に示したコントロール群と比較して、有意に低い値を示した(一元配置分散分析法(one-way variance analysis, ANOVA)およびスチューデントt検定, p<0.001)。

[0072] 試験例11

TGF-β1の測定

試験例9および10において、解剖時に各群のマウスから採血し、それらの血清を得た。そして、マウス血清中のTGF-β1濃度を、Quantikine Mouse/Rat/Porcine TGF-β1 Immunoassay(R&D systems社製)を用いて、ELISA法により測定した。その結果を図6に示す。

[0073] マウス血清中のTGF-β1濃度は、コントロール群では111.6±40.0pg/mLで

あった。一方、試験例9におけるA群では 80.5 ± 12.9 pg/mLであり、B群では 76.0 ± 6.3 pg/mLであり、C群では 74.3 ± 21.0 pg/mLであり、いずれの群もコントロール群と比較して有意に低い値を示した(一元配置分散分析法(one-way variance analysis, ANOVA)およびスチューデントt検定, $p < 0.001$)。

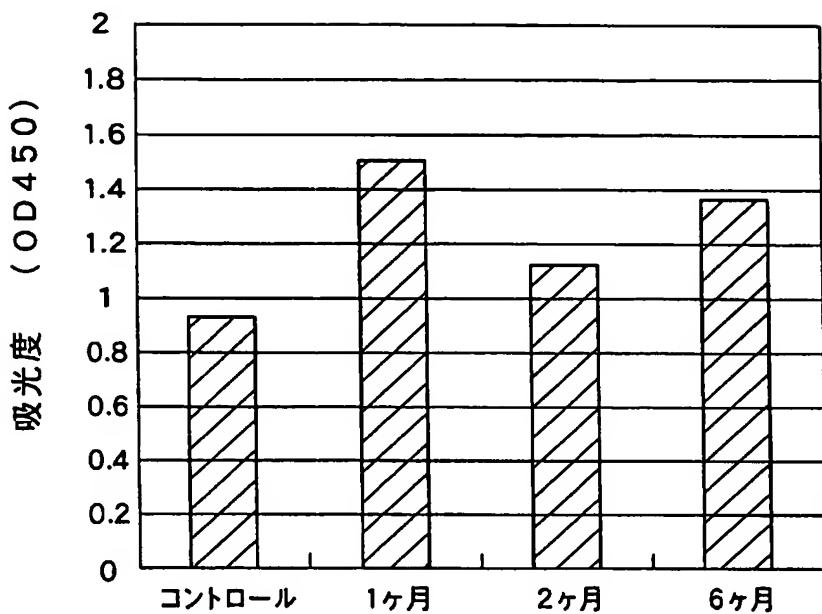
[0074] さらに、試験例10におけるC群では 99.4 ± 21.2 pg/mLであり、D群では 80.2 ± 17.2 pg/mLであり、E群では 72.9 ± 15.8 pg/mLであり、いずれの群もコントロール群と比較して有意に低い値を示した(一元配置分散分析法(one-way variance analysis, ANOVA)およびスチューデントt検定, $p < 0.001$)。

請求の範囲

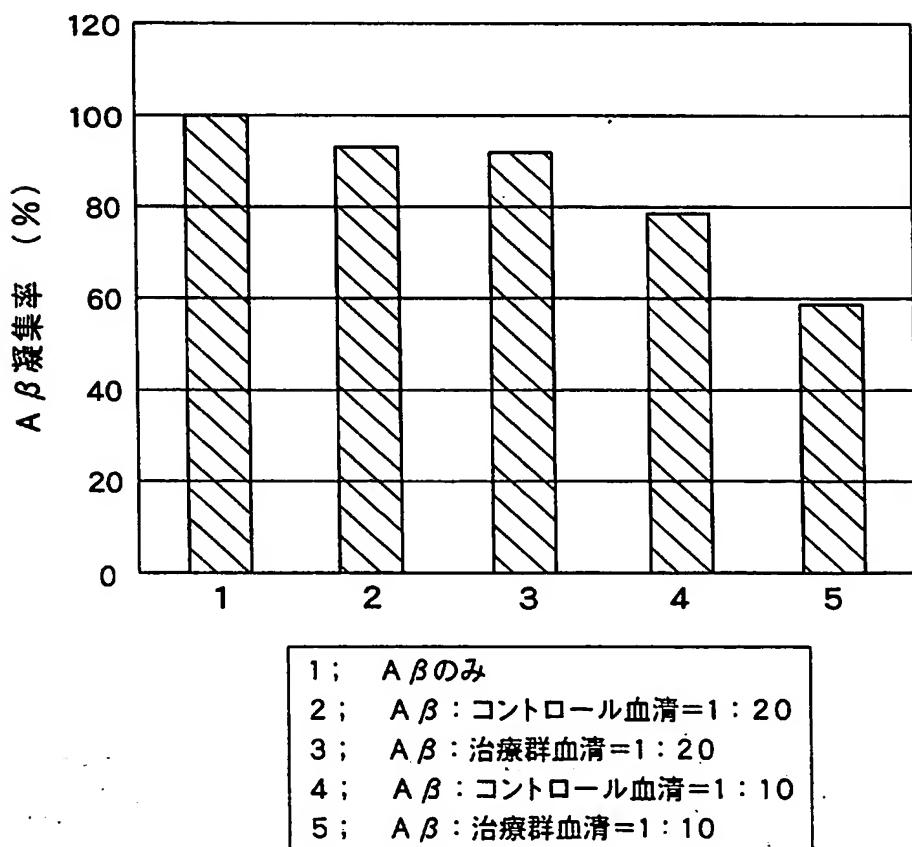
- [1] β アミロイドペプチドの液性免疫惹起部位を含むペプチド断片を発現しうるアデノ随伴ウィルスベクターであつて、該ペプチド断片をコードするDNAを機能しうる形で含んでなる、アデノ随伴ウィルスベクター。
- [2] 前記ペプチド断片が、 β アミロイドペプチドの第4ー10アミノ酸を含んでなるものである、請求項1に記載のアデノ随伴ウィルスベクター。
- [3] 前記ペプチド断片が、配列番号2で表されるアミノ酸配列中の第4ー10アミノ酸を含んでなるものである、請求項1に記載のアデノ随伴ウィルスベクター。
- [4] 前記ペプチド断片をコードするDNAが、配列番号1で表されるヌクレオチド配列中の第10ー30ヌクレオチドを含んでなるものである、請求項1に記載のアデノ随伴ウィルスベクター。
- [5] 前記ペプチド断片が、 β アミロイドペプチドの第1ー43アミノ酸を含んでなるものである、請求項1に記載のアデノ随伴ウィルスベクター。
- [6] 前記ペプチド断片が、配列番号2で表されるアミノ酸配列を含んでなるものである、請求項1に記載のアデノ随伴ウィルスベクター。
- [7] 前記ペプチド断片をコードするDNAが、配列番号1で表されるヌクレオチド配列を含んでなるものである、請求項1に記載のアデノ随伴ウィルスベクター。
- [8] 前記ペプチド断片が、 β アミロイドペプチドの第1ー21アミノ酸を含んでなるものである、請求項1に記載のアデノ随伴ウィルスベクター。
- [9] 前記ペプチド断片が、配列番号4で表されるアミノ酸配列を含んでなるものである、請求項1に記載のアデノ随伴ウィルスベクター。
- [10] 前記ペプチド断片をコードするDNAが、配列番号3で表されるヌクレオチド配列を含んでなるものである、請求項1に記載のアデノ随伴ウィルスベクター。
- [11] 前記ペプチド断片を細胞外に分泌させることができるシグナルペプチドをコードするDNAを、機能しうる形でさらに含んでなる、請求項1に記載のアデノ随伴ウィルスベクター。
- [12] 前記シグナルペプチドが、アミロイド前駆体タンパク質のシグナルペプチドである、請求項11に記載のアデノ随伴ウィルスベクター。

- [13] 前記シグナルペプチドが、配列番号6で表されるアミノ酸配列を含んでなるものである、請求項11に記載のアデノ随伴ウィルスベクター。
- [14] 前記シグナルペプチドをコードするDNAが、配列番号5で表されるヌクレオチド配列を含んでなるものである、請求項11に記載のアデノ随伴ウィルスベクター。
- [15] 請求項1ー14のいずれか一項に記載のアデノ随伴ウィルスベクターを含んでなる、アルツハイマー病を治療するための医薬組成物。
- [16] 経口投与のための、請求項15に記載の医薬組成物。
- [17] 治療上有効量の請求項1ー14のいずれか一項に記載のアデノ随伴ウィルスベクターを被験者に投与することを含んでなる、アルツハイマー病の治疗方法。
- [18] アルツハイマー病の治療剤の製造における、請求項1ー14のいずれか一項に記載のアデノ随伴ウィルスベクターの使用。

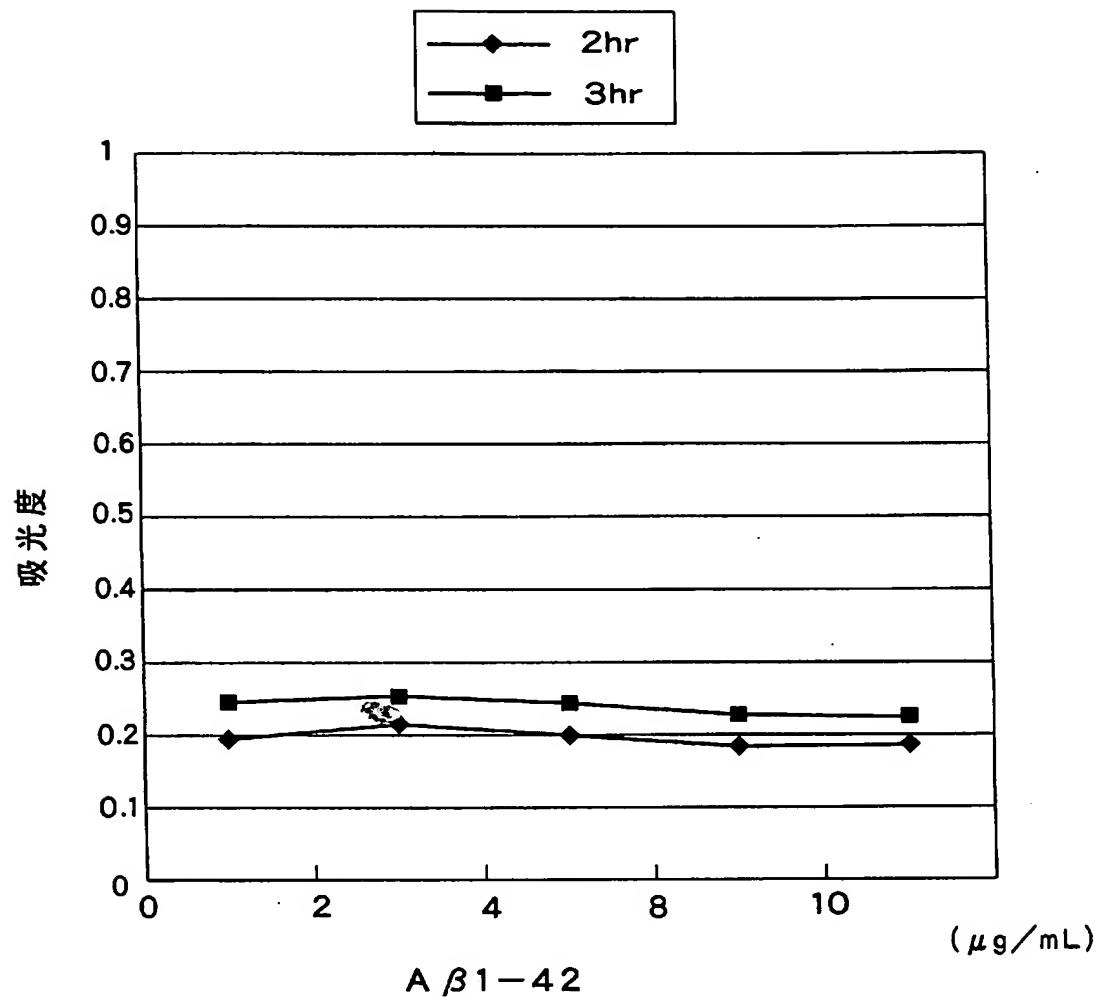
[図1]



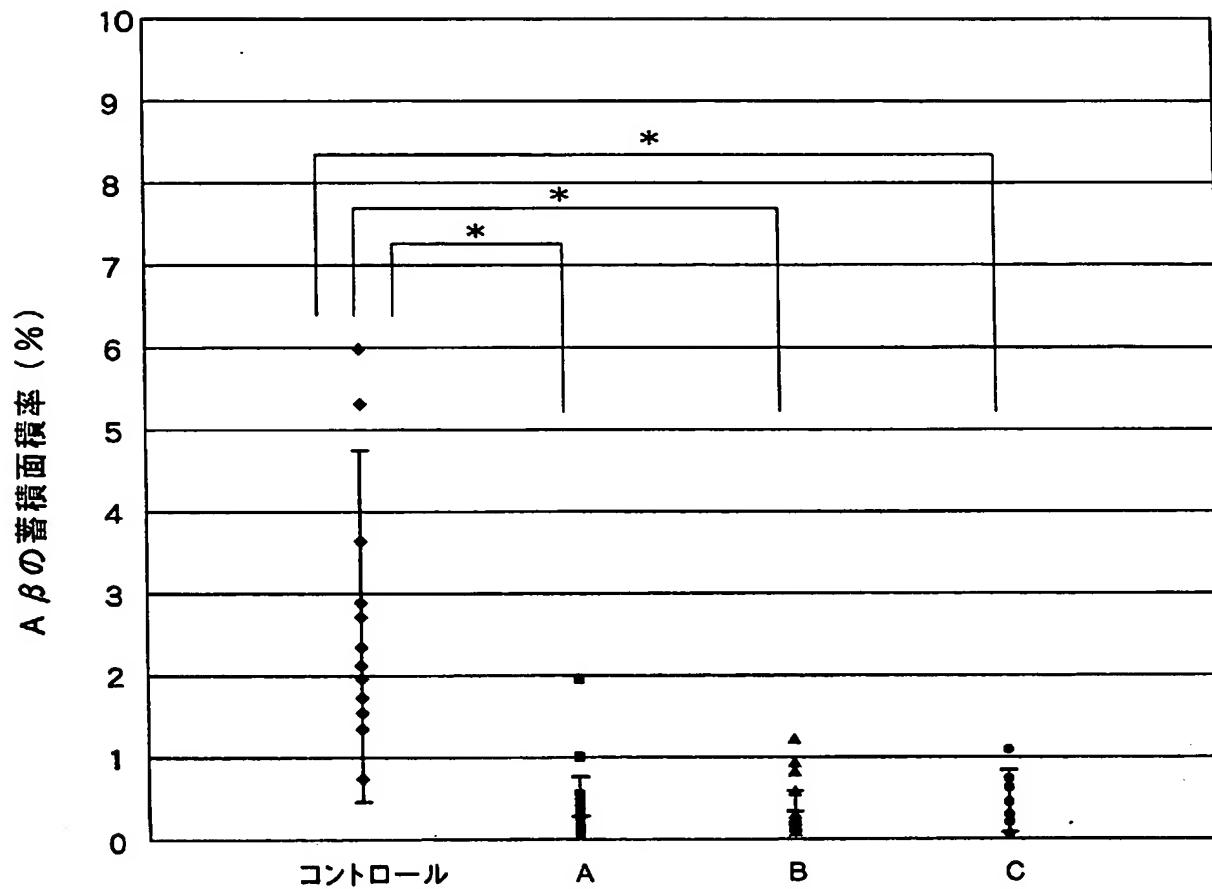
[図2]



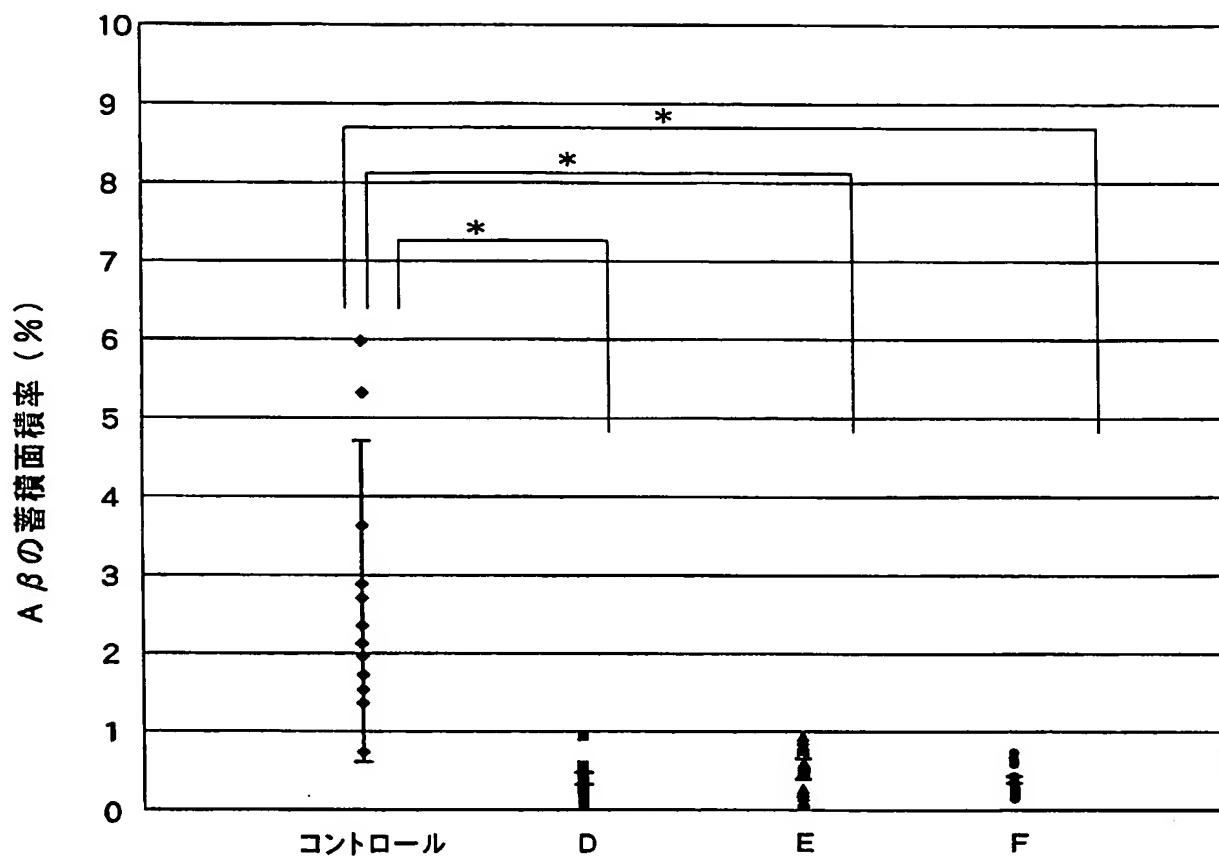
[図3]



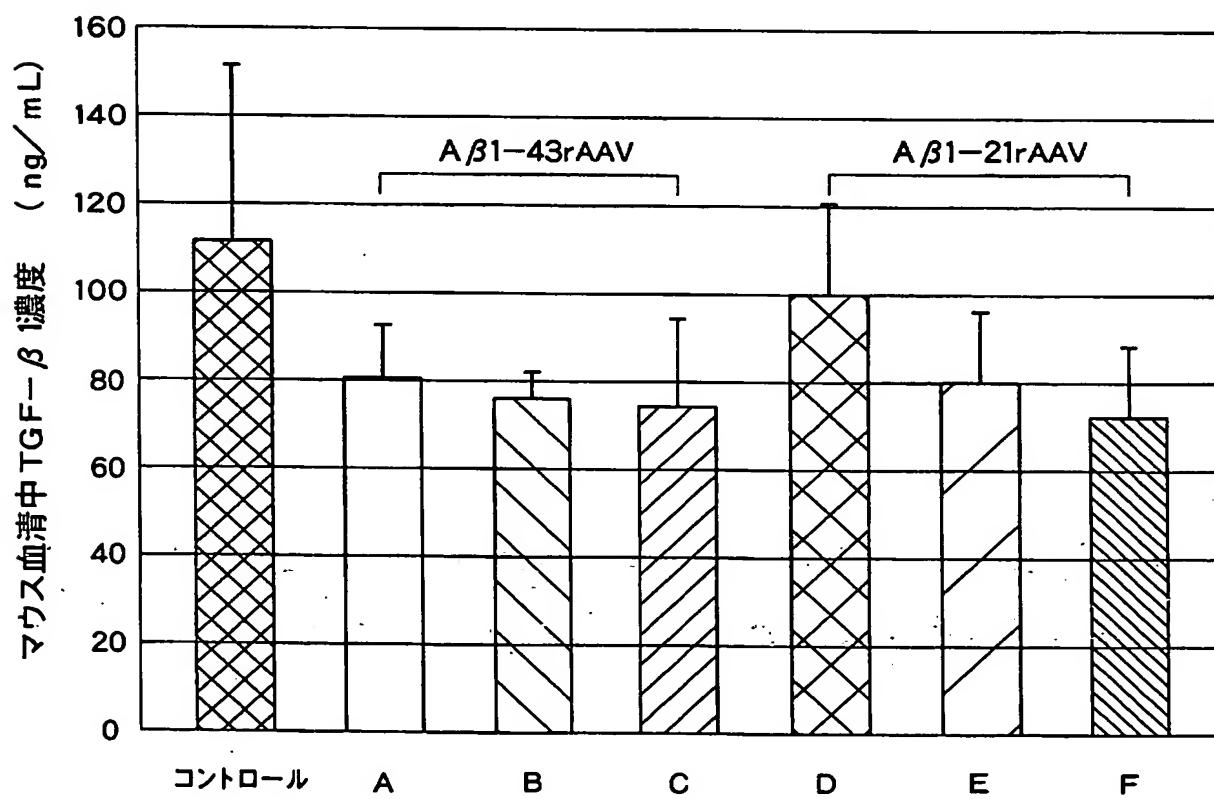
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008224

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/86, A61K48/00, A61K38/17, A61P25/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/86, A61K48/00, A61K38/17, A61P25/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, WPI/IDS (STN), SwissProt/PIR/GeneSeq,
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	BLAND, R.J. et al., "Generation of Rat Alzheimer's Disease Models utilizing Adeno-associated Virus to Targettransgenes to the Hippocampus", Society for Neuroscience Abstract Viewer and Itinerary Planner, (2002), Vol.2002, pp.Abstract, No.295.12., full text	1-14 15, 16, 18
L	CITRON, M. et al., "Mutation of the beta-Amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production", Nature, (1992), Vol.360, pages 672 to 674, full text, (A literature defining the structure of protein APP 695 SWE described in the literature No.1)	1-16, 18

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 August, 2004 (12.08.04)Date of mailing of the international search report
31 August, 2004 (31.08.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008224

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
L	NANG, J. et al., "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor", Nature, (1987), Vol.325, pages 733 to 736, full text, (A literature defining the structure of protein APP 695 SWE described in the literature No.1)	1-16, 18
L	LEWIS, P.A. et al., "Expression of BRI-amyloid beta peptide fusion proteins: a novel method for specific high-level expression of amyloid beta peptide", Biochim.Biophys.Acta., (2001), Vol.1537, pages 58 to 62, full text, (A literature defining the structure of protein BR1-A described in the literature No.1)	1-16, 18
Y	WO 99/27944 A1 (AHENA NEUROSCIENCES, INC.), 10 June, 1999 (10.06.99), Full text & EP 1033996 A & US 6246736 B1	1-16, 18
Y	ZHOU, S.Z. et al., "Adeno-associated Virus 2-mediated High Efficiency Gene Transfer into Immature and Mature Subsets of Hematopoietic Progenitor cells in Human Umbilical cord Blood", J.Exp.Med., (1994), Vol.179, pages 1867 to 1875, full text	1-16, 18
Y	JOHNSTONE, E.M. et al., "Nuclear and cytoplasmic Localization of the beta-Amyloid Peptide(1-43) in Transfected 293 cells", Biochem.Biophys.Res. Commun., (1996), Vol.220, pages 710 to 718, full test	11-16, 18
E,X	WO 2004/050876 A1 (AGTC GENE TECHNOLOGY CO., LTD.), 17 June, 2004 (17.06.04), Full text (Family: none)	1-10, 15, 16, 18
A	WO 02/096350 A2 (UNITED BIOMEDICAL, INC.), 05 December, 2002 (05.12.02), Examples & US 2003-68352 A1	1-16, 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008224

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - a sequence listing
 - table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - in written format
 - in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing
 - contained in the international application as filed
 - filed together with the international application in computer readable form
 - furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008224

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claim No.: 17

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The invention of claim 17 is directed to a therapeutic method falling under the methods for treatment of a human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search under the provisions of PCT Article 17(2) (a) (i) and Rule 39.1(iv).

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The matter common to claims 1-16 and 18 is "an adeno-associated virus vector capable of expressing a peptide fragment containing a liquid immunity induction region of β -amyloid peptide, which comprises a DNA coding for the peptide fragment in functioning form".

However, search has revealed that this common matter is not novel because it is disclosed in the reference (BLAND, R.J. et al., Society for Neuroscience Abstract Viewer and Itinerary Planner, (2002), Vol.2002, pp. Abstract No.295.12.).

Consequently, this common matter falls within the category of prior art and (continued to extra sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008224

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

hence cannot be regarded as special technical features.

Therefore, the inventions of the claims are to be classified into those having special technical feature in "locating the liquid immunity induction region at the 4th to 10th amino acids of β -amyloid peptide", having special technical feature in the adeno-associated virus vector "containing a DNA coding for a signal peptide" and having special technical feature in "providing a therapeutic agent for treatment of Alzheimer" with the use of adeno-associated virus vector.

Accordingly, it appears that the claims recite three general inventive concepts relating to adeno-associated virus vector.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl. 7 C12N 15/86, A61K 48/00, A61K 38/17, A61P 25/28

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl. 7 C12N 15/86, A61K 48/00, A61K 38/17, A61P 25/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, WPIDS(STN)

SwissProt/PIR/GeneSeq

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	BLAND, R. J. et al., "Generation of Rat Alzheimers Disease Models utilizing Adeno-associated Virus to Targettransgenes to the Hippocampus", Society for Neuroscience Abstract Viewer and Itinerary Planner, (2002), Vol. 2002, pp. Abstract No. 295. 12., 全文	1-14
Y	CITRON, M. et al., "Mutation of the beta-Amyloid precursor protein in familial Altzheimer's disease increases beta-protein production" Nature, (1992), Vol. 360, pp. 672-674, 全文 (文献1に記載のAPP 695 SWEタンパク質の構造を特定する文献)	15, 16, 18
L	CITRON, M. et al., "Mutation of the beta-Amyloid precursor protein in familial Altzheimer's disease increases beta-protein production" Nature, (1992), Vol. 360, pp. 672-674, 全文 (文献1に記載のAPP 695 SWEタンパク質の構造を特定する文献)	1-16, 18

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 08. 2004

国際調査報告の発送日

31. 8. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I.S.A./J.P.)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

田中 晴絵

4 B 3334

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
L	KANG, J. et al., "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor", Nature, (1987), Vol. 325, pp. 733-736, 全文 (文献1に記載のAPP 695 SWEタンパク質の構造を特定する文献)	1-16, 18
L	LEWIS, P. A. et al., "Expression of BRI-amyloid beta peptide fusion proteins: a novel method for specific high-level expression of amyloid beta peptide", Biochim. Biophys. Acta., (2001), Vol. 1537, pp. 58-62, 全文 (文献1に記載のBR1-A β 42タンパク質の構造を特定する文献)	1-16, 18
Y	WO 99/27944 A1, (ATHENA NEUROSCIENCES, INC.), 1999. 06. 10, 全文 & EP 1033996 A & US 6246736 B1	1-16, 18
Y	ZHOU, S. Z. et al., "Adeno-associated Virus 2-mediated High Efficiency Gene Transfer into Immature and Mature Subsets of Hematopoietic Progenitor cells in Human Umbilical cord Blood", J. Exp. Med., (1994), Vol. 179, pp. 1867-1875, 全文	1-16, 18
Y	JOHNSTONE, E. M. et al., "Nuclear and cytoplasmic Localization of the beta-Amyloid Peptide(1-43) in Transfected 293 cells", Biochem. Biophys. Res. Commun., (1996), Vol. 220, pp. 710-718, 全文	11-16, 18
EX	WO 2004/050876 A1, (AGTC GENE TECHNOLOGY COMPANY LTD.), 2004. 06. 17, 全文 (ファミリーなし)	1-10, 15, 16, 18
A	WO 02/096350 A2, (UNITED BIOMEDICAL, INC.), 2002. 12. 05, EXAMPLE & US 2003-68352 A1	1-16, 18

第I欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第1ページの1. bの続き）

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ 配列表

配列表に関連するテーブル

b. フォーマット 書面

コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 出願時の国際出願に含まれる

この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

第二欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 17 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲17に記載の発明は治療方法であり、治療による人体の処置方法に該当し、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第三欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-16, 18に共通の事項は「 β アミロイドペプチドの液性免疫惹起部位を含むペプチド断片を発現しうるアデノ随伴ウイルスベクターであって、該ペプチド断片をコードするDNAを機能し得る形で含んでなるアデノ随伴ウイルスベクター」である。

しかしながら、調査の結果、上記共通事項は文献（BLAND, R. J. et al., Society for Neuroscience Abstract Viewer and Itinerary Planner, (2002), Vol. 2002, pp. Abstract No. 295.12.）に開示されているから、新規でないことが明らかとなった。

結果として、上記共通事項は先行技術の域をでないから、上記共通事項を特別な技術的特徴とはできない。

それ故、請求の範囲に記載された発明は、「液性免疫惹起部位を β アミロイドペプチドの第4~10アミノ酸に特定したこと」に特別な技術的特徴を有するものと、アデノ随伴ウイルスベクターが「シグナルペプチドをコードするDNAを含んでいること」に特別な技術的特徴を有するもの、さらに、アデノ随伴ウイルスベクターを用いた「アルツハイマーを治療するための治療剤の提供」に特別な技術的特徴を有するものに分類される。

してみれば、請求の範囲には、アデノ随伴ウイルスベクターに係る、3つの一般的発明概念が記載されていると認める。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつた。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかつた。